



Patent dodatkowy
do patentu nr _____

Zgłoszono: 19.05.75 (P. 180520)

Pierwszeństwo: _____

Zgłoszenie ogłoszono: 25.04.77

Opis patentowy opublikowano: 30.11.79

Int. Cl.²
C12D 9/14

Twórca wynalazku: _____

Uprawniony z patentu: Pfizer Inc., Nowy Jork (Stany Zjednoczone
Ameryki)

**Sposób wytwarzania mieszaniny antybiotyków 35763, 36926,
37277 i 37932**

1

Przedmiotem wynalazku jest sposób wytwarzania mieszaniny antybiotyków 35763, 36926, 37277 i 37932 o działaniu synergistycznym.

W piśmiennictwie, dotyczącym antybiotyków, znane są liczne doniesienia, związane ze zjawiskiem synergizmu: The Journal of Antibiotics 25, no. 6, 371 (1972); J. Chem. Soc. 190, 1653 (1966); Bull. Soc. Chim. Belg. 68, 716 (1959); J. Amer. Chem. Soc. 82, 4414 (1960); Tetrahedron Letters 2687 (1971); J. Antibiotics. Soc. A 14 (1961); Nature 187, 598 (1960); J. Chem. Soc. 2286 (1960); Antimicrobial Agents nad Chemotherapy 360—365 (1964); Tetrahedron Letters 4231—4238 (1966); Organic Mass Spectrometry 6, 151—166 (1972); Tetrahedron Letters 369—372 (1966) oraz J. Chem. Soc. 190, 1669—1676 (1966).

Mieszanina antybiotyków o działaniu synergistycznym, wytwarzana sposobem według niniejszego wynalazku należy do grupy innych mieszanin synergistycznych: mikamycyny, prystinamycyny, ostreogrycyny, streptograminy, antybiotyku P.A. 114, vernamycyny i wirginiamycyny.

Wytwarzaną sposobem według wynalazku mieszaninę antybiotyków, stanowiących związki 35763 i/lub 36926 i/lub 37277 i/lub 37932, stosuje się w ilości 10—100 ppm jako składnik biologicznie czynny mieszanki paszowej, zwiększającej wzrost i podnoszącej wydajność żywienia zwierząt.

Wchodzący w skład mieszaniny antybiotyków związek 37277 w postaci krystalicznej wykazuje

2

skręcalność optyczną $(\alpha)_{D}^{25^{\circ}} = +11^{\circ}$ w etanolu o stężeniu 1%, charakterystyczne widmo w nadfiolecie z maksimami absorpcji roztworu etanolowego przy 225, 274, 282, 303 i 355 mμ, absorpcję właści-

wą $E_{1\text{ cm}}^{1\%}$ odpowiednio 309,3, 36,67, 45,01, 70 i 20. jego skład w analizie wagowej charakteryzuje się zawartością 60,91% węgla, 5,98% wodoru, 10,45% azotu i 22,66% tlenu (z różnicy), zaś jego roztwór chloroformowy wykazuje widmo w podczerwieni, charakteryzujące się pasmami absorpcji przy: 3,05, 3,40, 5,70, 5,77, 5,93, 6,07, 6,62, 6,82 i 7,67 mikronów.

Wchodzący w skład mieszaniny antybiotyków związek 36926 charakteryzuje się zawartością 57,89% węgla, 6,78% wodoru, 8,04% azotu i 27,99% tlenu (z różnicy), posiada sumaryczny wzór $C_{26}H_{35}N_3O_7$ i wykazuje skręcalność optyczną $(\alpha)_{D}^{25^{\circ}} = -130^{\circ}$ w 1% roztworze w etanolu, absorpcję w ultrafiolecie roztworu etanolowego charakteryzującego się maksimum przy 214 mμ i absorpcji właściwej $E_{1\text{ cm}}^{1\%} = 723,8$, oraz posiada charakterystyczne pasma absorpcji w podczerwieni (tabletki KBr) przy 2,95, 3,40, 5,75, 5,98, 6,23, 6,58, 6,87, 7,45, 8,25, 8,38, 8,80, 9,08, 10,15, 10,35, 11,10 i 13,30 mikronów.

Wchodzący w skład mieszaniny antybiotyków związek 37932 w postaci krystalicznej wykazuje skręcalność optyczną $(\alpha)_{D}^{25^{\circ}} = +5,0$ w stężeniu 0,25% w chloroformie, roztwór etanolowy wyka-

zuje widmo w nadfiolecie z charakterystycznymi maksymami przy 226, 276, 283, 305 i 355 mμ i absorpcję właściwą E_{1%}^{1cm} odpowiednio 304.4, 36.8, 43.49, 70.25 i 20.07, w analizie wagowej charakteryzuje się składem 59.41% węgla, 6.01% wodoru, 10.66% azotu, 23.92% tlenu (z różnicy), oraz posiada charakterystyczne pasma absorpcji w podczerwieni (tabletki KBr) przy 2.96, 3.05, 3.38; 5.68, 5.73, 5.93, 5.98, 6.13, 6.50, 6.58, 6.88, 7.40, 7.65, 8.08, 8.45, 8.60, 9.03, 9.45, 9.70, 9.98, 10.55, 11.00, 11.25, 11.60, 12.35 i 13.25 mikronów.

Mieszanina antybiotyków, stanowiąca składnik biologicznie czynny mieszanki paszowej, wytwarzana jest przez szczep *Actinoplanes auranticolor* ATCC 31011 w napowietrznej hodowli podpowierzchniowej na płynnym podłożu, zawierającym przyswajalne źródło węgla i azotu aż do uzyskania znacznego stężenia antybiotyków w brzeczce, a następnie poszczególne antybiotyki lub ich mieszaninę izoluje się z hodowli. Mieszaninę stanowią związki o charakterze makrocyklicznych laktonów i depsyptydy, które rozdziela się i izoluje z brzeczki fermentacyjnej metodami ekstrakcji przy użyciu rozpuszczalników, rozdziału przeciwradowego, chromatografii kolumnowej, bądź kilkoma wymienionymi metodami łącznie. Poszczególne antybiotyki, wchodzące w skład mieszaniny, charakteryzują się działaniem antybiotycznym. Surowy preparat mieszaniny antybiotyków lub wydzielone z mieszaniny czyste związki o charakterze makrocyklicznych laktonów i czyste związki depsyptydowe wykazują w znacznym stopniu synergistyczne działanie antybiotyczne. Surowa mieszanina antybiotyków, czyste pojedyncze antybiotyki, wchodzące w jej skład, oraz czyste związki o charakterze makrocyklicznych laktonów i związki depsyptydowe wykazują działanie jako stymulatory wzrostu piskląt i świń, jak również stosowane są jako czynniki terapeutyczne w zwalczaniu biegunki świń.

Drobnoustroj, stosowany przy wytwarzaniu antybiotyków sposobem według wynalazku, został wyizolowany z prób ziemi z Egiptu. Hoduje się go na agarze kartoflano-marchwiowym. Drobnoustroj ten należy do klasy aktynomycetes, wytwarza sporangia podobnie, jak drobnoustroje z rodzaju *Actinoplanes*. Dlatego do hodowli tego drobnoustroju stosuje się takie same podłoża jak do badań drobnoustrojów z tego rodzaju. Zawiesiny tego drobnoustroju przygotowuje się w ten sposób, że kawałki hodowli agarowej rozgniatą się w małych probówkach, zawierających 0,2 ml sterylnej wody destylowanej, zawartość wypłukuje się wodą destylowaną sterylną w takiej ilości, aby uzyskać łącznie objętość 5 ml hodowli. Tak sporządzoną zawiesinę stosuje się do przeszczepiania hodowli na różne podłoża w probówkach, skosach agarowych, jak też na płytkach Petriego. Hodowle inkubuje się w temperaturze 28°C, z wyjątkiem przypadków specjalnie zaznaczonych. Odczyty dokonywane są w odstępach czasu w ciągu 22 dni dla niektórych badań, a dla większości po 14 dniach. Barwy hodowli odczytywane według Słownika barw, drugie wydanie, z 1950 r. wg. Maerz i

Paul'a, jak również według własnych opisów. Nowy szczep (Pfizer F.D. 24 090) złożono w kolekcji szczepów American Type Culture Collection w Rockville, Maryland, 11 marca 1974, gdzie została zarejestrowana jako *Actinoplanes auranticolor* ATCC 31011. Ciągłość hodowli i jej powszechna dostępność będą zagwarantowane po uzyskaniu praw patentowych. Dostępność do hodowli w okresie zatwierdzania zgłoszenia jest zastrzeżona prawnie Postanowieniem 14 i 35 USC 112. Wszystkie zastrzeżenia związane z powszechną dostępnością zdeponowanego szczepu zostaną usunięte po uzyskaniu praw patentowych.

Podłoża, służące do identyfikacji i charakterystyki hodowli, jak również odnośniki literaturowe ze składem podłoży podane są poniżej:

- 2% agar w wodzie wodociągowej,
- Agar kartoflano-marchwiowy. M. P. Lechevalier, J. Lab. & Clin. Med. 71, 934—944 (1968).
Stosuje się tylko 30 g kartofli i 2,5 g marchwi, lecz 20 g agaru.
- Agar Czapek'a-sacharozowy. Waksman, S.A., The Actinomycetes 2, 328 (1961) Podłoże No. 1, strona 328.
- Agar glukozowo-asparaginowy. Waksman, jak powyżej, Podłoże No. 2, strona 328.
- Agar z ekstraktem z drożdży i ekstraktem słodowym. Antibiotics Ann. 1956/1957, strony 947—953.
- Agar Hickey'a i Tresnera J. Bact. 64, 891—892 (1952).
- Agar kartoflano-glukozowy. 100 g obranych i pociętych kartofli w 500 ml wody ogrzewa się w parze, filtruje przez lniane płótno, dodaje 10 g glukozy, 20 g agaru i uzupełnia wodą do objętości 1 litra.
- Agar skrobiowy. J. Bact. 73, 15—27 (1957)
- Żelatyna. J. Bact. 73, 15—27 (1957).
- Agar tyrozynowy. J. Bact. 69, 147—150 (1955).
- Agar peptonowo-żelazowy. Difco
- Mleko odtłuszczone Difco
- Bulion dekstrozowo-azotanowy. Waksman, S.A., The Actinomycetes 2, 328 (1961). Podłoże No. 1 z dodatkiem 3.0 g glukozy w miejsce sacharozy bez dodatku agaru.
- Bulion z dodatkiem azotanów organicznych. J. Bact. 73, 15—27 (1957).
- Podłoże ATCC 172. Katalog American Type Culture, wydanie 10, strona 235 (1972).
- Podłoże do badań wykorzystania węgla. J. Bact., 56, 107—114 (1948).

Opis hodowli na różnych podłożach:

Agar zwyczajny na wodzie wodociągowej — wzrost słaby, rzadki, spłaszczone, prawie 9D2 (bladodrózowy); brak grzybni powietrznej; grzybnia podstawowa bezbarwna do 9D2; brak pigmentu rozpuszczalnego.

Agar Czapek'a-sacharozowy — wzrost umiarkowany prawie dobry, spłaszczony, prawie 9G6 (bladopomarańczowy); brak grzybni powietrznej; grzybnia podstawowa prawie 9G6; brak pigmentu rozpuszczalnego.

Agar glukozowo-asparaginowy — wzrost umiarkowany, wznoszący się, chropowaty, prawie 9L9

(lekko pomarańczowa); brak grzybni powietrznej; brak pigmentu rozpuszczalnego.

Agar z ekstraktem z drożdży i ekstraktem słodowym — brak wzrostu.

Agar Hickeya i Tresnera — wzrost umiarkowany prawie dobry lekko wznoszący się i chropowaty, prawie 9F9 (pomarańczowa matowa); na powierzchni jasno białawy meszek; grzybnia podstawowa prawie 9I8; pigment rozpuszczalny lekko brązowawy.

Agar kartoflano-glukozowy — wzrost umiarkowany, wznoszący się, chropowaty, prawie 9L9 (jasno pomarańczowa); brak grzybni powietrznej; grzybnia podstawowa prawie 9L9; brak pigmentu rozpuszczalnego.

Agar tyrozynowy — wzrost słaby prawie umiarkowany, spłaszczony, prawie 13A10 (czerwonawo pomarańczowy, matowy); brak grzybni powietrznej; grzybnia podstawowa prawie 10D11; pigment rozpuszczalny brązowy.

Zelatylna — wzrost umiarkowany, spłaszczony, prawie 9KL2 (czerwonawo pomarańczowy); brak pigmentu rozpuszczalnego.

Agar skrobiowy — wzrost umiarkowany prawie dobry, wznoszący się, prawie 9KI0 (pomarańczowy); lekko białawy meszek; grzybnia podstawowa prawie 9KI0; pigment rozpuszczalny blado żółty.

Skrobia hydrolizowana jest w stopniu słabym; upłynianie żelatyny intensywne; redukcja azotanów do azotynów nie zachodzi na żadnym z podłożi nawet po 22 dniach hodowli (obserwuje się bardzo słaby wzrost na bulionie dekstrozo-azotanowym i dobry na bulionie z azotanami organicznymi; wytwarzanie H_2S jest słabe; na agarze peptonowo-żelazowym brak pigmentu rozpuszczalnego; nie obserwuje się koagulacji, bądź hydrolizy mleka nawet po 22 dniach hodowli; tyrozyna nie jest rozkładana; na podłożu ATCC 172 obserwuje się dobry wzrost w temperaturze 21–37°C, przy czym optymalna temperatura wynosi 28–37°C; brak wzrostu w temperaturze 45°C. Zużywane są cukry arabinoza, fruktoza, glukoza, mannitol, rafinoza, ramnoza, sacharoza i ksyloza, natomiast nie obserwuje się wykorzystywania inozytolu. Na żadnym podłożu nie wydzielają zapach.

Sporangia wytwarzane są jedynie na agarze kartoflano-marchwiowym. Tworzą one warstwę pali-sadową. Wymiary sporangów wynoszą 5,5–11 × 4,5–8 mikronów szerokości i 9–12 mikronów wysokości. Sporangia występują w całkiem dużej ilości, posiadają nieregularny kształt, a przez ich stopniowe rozmiększanie następuje uwolnienie spor. Sporangia z agaru kartoflano-marchwiowego po trzytygodniowej inkubacji uwalniają spory, w warunkach gdy fragmenty hodowli zanurza się w ciągu kilku godzin w temperaturze 21°C w roztworze 1 g glukozy i 1 ml Tween 80 w objętości 1 litra wody (jest to modyfikacja roztworu, stosowanego przez M. L. Higgins'a, J. Bact., 94: 495–498, 1967). Spory w sporangium ułożone są w kształcie nieregularnych łańcuchów, a po uwolnieniu przyjmują kształt kulisty o średnicy 1,6 mikrona lub rozszerzonej elipsy o wymiarach 1,6–

2,2 × 1,1–1,6 mikronów. Prawie wszystkie wykazują zdolność poruszania się.

Przy wstępnej identyfikacji porównywano tę hodowlę z *A. auranticolor* ATCC 15330. Nowo wyizolowany szczep *A. auranticolor* ATCC 31011 jest podobny do szczepu *A. auranticolor* ATCC 15330 pod względem cech morfologicznych, barwy i wartości rozpuszczalnego pigmentu na agarze Ben-
10 netta, agarze odżywczym, agarze glukozowo-asparaginowym, agarze glicerolo-asparaginowym, agarze z jabłczanem wapnia i agarze tyrozynowym.

Zadna z hodowli nie redukuje azotanów do azotynów; obydwie hodowle wytwarzają małe ilości H_2S , a na agarze peptonowo-żelazowym nie wytwarzają melaninu; obydwie hydrolizują skrobię. Szczep *A. auranticolor* ATCC 15330 nie powoduje żadnych zmian odtłuszczonego mleka, podczas gdy hodowla nowego szczepu spowodowała sklarowanie mleka w trzech próbkach z sześciu badanych, a po 21 dniach powstał żółto-kremowy rozpuszczalny pigment.

Szczep *A. auranticolor* ATCC 31011 zużywa glukozę, arabinozę, fruktozę, mannitol, rafinozę, ramnozę, sacharozę i ksylozę. Szczep *A. auranticolor* ATCC 15330 zużywa również wszystkie wymienione cykry z wyjątkiem rafinozy. Sporangia i spory obydwu hodowli są podobne, przy czym spory *A. auranticolor* 15330 mają kształt bardziej wydłużony.

Najistotniejsza różnica pomiędzy szczepami polega na tym, że szczep *A. auranticolor* ATCC 15330 w hodowli podpowierzchniowej nie wytwarza antybiotyku, podczas gdy szczep *A. auranticolor* ATCC 31011 wytwarza mieszaninę w/w antybiotyków.

Hodowlę szczepu *A. auranticolor* ATCC 31011 prowadzi się na płynnym podłożu, metodą podpowierzchniową, stosując napowietrzanie i mieszanie w temperaturze 28–36°C. Podłoża hodowlane zawierają przyswajalne źródło węgla, jak na przykład cukry, skrobię i melasę; źródło azotu organicznego, jak kazeinę, enzymatyczny hydrolizat kazeiny, mąkę sojową, mąkę z ziaren bawełny, mąkę z orzechów ziemnych i gluten pszeniczny. Dobre wyniki uzyskuje się, dodając do podłoża czynniki wzrostowe, takie jak rozpuszczalny siód gorzelniany, mąka rybna, ekstrakt drożdżowy oraz sole, jak chlorek sodu i węglan wapnia, śladowe ilości metali żelaza, magnezu, cynku, kobaltu i manganu. W przypadku pienienia podłoża fermentacyjnego
50 dodaje się czynniki przeciwpienne, jak oleje roślinne lub silikonowe środki gaszące pianę. Podłoża fermentacyjne napowietrza się, podając 1/2 do 2 objętości czystego powietrza na objętość brzo-
55 ki na minutę. Podłoże miesza się przy użyciu urządzeń, stosowanych w przemyśle fermentacyjnym. Podczas przeszczepiania i w czasie hodowli szczepu muszą być zachowane warunki jakości.

Inoculum do przeszczepienia hodowli, wytwarzającej mieszaninę antybiotyków, otrzymuje się przez przeniesienie szczepu ze skosu agarowego na podłoże hodowlane, jak na przykład podłoże ATCC 172, opisane w odnośniku literaturowym podanym uprzednio. Szczep ze skosu stosuje się do posiewania hodowli w kolbach lub w tankach fermentacyjnych, można też przygotować hodowlę posie-

wową w tankach przez przeszczepienie hodowli kolbowej. W trzęsawkowej hodowli w kolbach maksymalny wzrost osiąga się po 4 dniach, podczas gdy hodowla posiewowa w tankach osiąga najlepszy wzrost po 2 lub 3 dniach. W hodowli produkcyjnej najwyższą aktywność antybiotyku uzyskuje się po 20 do 30 godzinach fermentacji.

Przebieg procesu wytwarzania antybiotyku kontroluje się przy pomocy znanej metody biologicznej określenia aktywności antybiotycznej wobec wrażliwego szczepu *Staphylococcus aureus*. Aktywność antybiotyku w brzezce oznacza się przy użyciu standardowej metody płytkowej i krążków bibułowych wysyconych badaną brzezką na podstawie wielkości strefy zahamowania wzrostu szczepu wzorcowego wokół krążka. Po osiągnięciu maksymalnego stężenia antybiotyku w brzezce, produkty fermentacji izoluje się z całej brzezki, bądź z przesączu. W tym ostatnim przypadku grzybnię usuwa się przez filtrację lub wirowanie. Do tego celu używane są prasy filtracyjne, wirówki lub inne urządzenia.

Analizę mieszaniny antybiotyków w hodowli, jak również z surowych i oczyszczonych preparatach, ekstrahowanych z brzezki fermentacyjnej, przeprowadza się przy pomocy chromatografii cienkowarstwowej na żelu krzemionkowym. Rozdział mieszaniny antybiotyków na składniki zależy w znacznym stopniu od zawartości antybiotyku. Zbyt małe stężenie uniemożliwia wydzielanie składników, występujących w mniejszości; zbyt duże stężenie antybiotyku nie pozwala na dobry rozdział w wyniku ciągnięcia się składników, występujących w dużym stężeniu.

Układem rozwijającym w chromatografii cienkowarstwowej jest mieszanina chloroform-etanol (9:1). Chromatogram po rozwinięciu ogląda się w świetle ultrafioletowym przy długości fali 254 mμ i 366 mμ. Identyfikację składników antybiotyku przy pomocy bioautografii przeprowadza się w ten sposób, że płytkę z żelem umieszcza się na agarze odżywczym, zaszczerpionym wrażliwym szczepem *Staphylococcus aureus* lub innego drobnoustroju.

Głównymi składnikami mieszaniny antybiotyków, wytwarzanych przez szczep *A. auranticolor* ATCC 31011 są związki o charakterze makrocyklicznego laktonu i związki depsypeptydowe. Występowanie lub brak któregoś ze składników, jak również procentowa zawartość składników jest różna w różnych fermentacjach i zależy od czasu trwania biosyntezy, pH i składu podłoża. Różne warunki, podane w przykładach, wpływają na to, że głównymi składnikami są związek 37 277 (depsypeptydowy) i 36 926 (makrocykliczny lakton), a składnikami występującymi w małej ilości są związki 37 932 (depsypeptydowy) i 35 763 (makrocykliczny lakton).

Poszczególne składniki mieszaniny antybiotyków izoluje się i rozdziela różnymi metodami, jak ekstrakcja rozpuszczalnikami, rozdział przeciwradowy Craiga, chromatografia kolumnowa lub kilkoma wymienionymi metodami łącznie. Ekstrakcję antybiotyków z brzezki prowadzi się różnymi rozpuszczalnikami, jak chloroform, octan etylu i

keton metylo-izobutyłowy. Do ekstrakcji antybiotyków stosuje się rozpuszczalniki w ilości 1/3 do 1/2, bądź równej objętości brzezki, ekstrahując dwukrotnie w pH = 7. W zależności od objętości brzezki, do przeprowadzenia ekstrakcji stosuje się różnorodną aparaturę, jak lejki rozdzielcze, ekstraktory z mieszalnikami, mechaniczne ekstraktory, separatory i inne.

Szczególnie przydatna metoda izolacji i rozdziału składników mieszaniny antybiotyku polega na tym, że brzezkę niesączoną lub klarowny bulion po doprowadzeniu pH do wartości 7 ekstrahuje się dwukrotnie 1/3 do 1/2 objętości ketonu metylo-izobutyłowego. Ekstrakt zatęża się przy zmniejszonym ciśnieniu, a następnie odtłuszcza się przez ekstrakcję heptanem lub eterem naftowym. Zatężony ekstrakt po odtłuszczeniu odparowuje się przy zmniejszonym ciśnieniu do suchej pozostałości. Uzyskany preparat poddaje się przeciwradowemu rozdziałowi metodą Craiga (6 płyt) w układzie rozpuszczalników: toluen (5 części) : etanol (2 części) : bufor fosforanowy pH = 4.5 (3 części). Aparat napełnia się fazą górną i fazą dolną po ich uprzednim rozdzieleniu. Po zakończeniu podziału, frakcje poddaje się chromatografii cienkowarstwowej, a następnie odparowuje do suchej pozostałości przy zmniejszonym ciśnieniu.

Preparat uzyskany z frakcji, zawierających związki depsypeptydowe, rozpuszcza się w chloroformie, dodaje węgiel aktywowany, sączy i przesącz odparowuje przy zmniejszonym ciśnieniu. Pozostałość po odparowaniu chloroformu rozpuszcza się w acetonie. Po dodaniu heptanu wytrąca się osad, który rozpuszcza się ponownie w małej ilości chloroformu i nanosi na kolumnę, wypełnioną żelem krzemionkowym buforowanym w pH = 6, i rozwija kolumnę układem chloroform: n-propa-
 nol (99:1% v/v) stosując ciśnienie 80 psi. Przy napełnianiu kolumny, żel zawiesza się w tym samym układzie. Funkcje, zebrane przy rozdziale, poddaje się chromatografii cienkowarstwowej w celu identyfikacji związków. Frakcje, zawierające związki depsypeptydowe, łączy się, odparowuje przy zmniejszonym ciśnieniu i poddaje krystalizacji z mieszaniną rozpuszczalników aceton-heptan.

Frakcje po rozdziale, zawierające związki typu makrocyklicznych laktonów, łączy się i odparowuje przy zmniejszonym ciśnieniu, uzyskując suchą pozostałość, którą rozpuszcza się w octanie etylu. Roztwór miesza się z żelem krzemionkowym, sączy i przesącz odparowuje przy zmniejszonym ciśnieniu. Pozostałość rozpuszcza się w octanie etylu i wytrąca osad heksanem. Osad ten rozpuszcza się w małej ilości chloroformu i poddaje rozdziałowi chromatograficznemu na kolumnie, wypełnionej buforowaną w pH = 6 żelem krzemionkowym, zawieszonym w octanie etylu. Kolumnę rozwija się, stosując ciśnienie 80 psi, przy użyciu układu rozpuszczalników: octan-czterowodorofuran-heksan (80:20:20), wysyconego buforem fosforanowym o pH = 6.0. Frakcje z kolumny poddaje się chromatografii cienkowarstwowej i te, które zawierają związki typu makrocyklicznych laktonów, łączy się i odparowuje przy zmniejszonym ciśnieniu. Poszczególne frakcje poddaje się

przeciwprądowemu rozdzielaniu Craiga i/lub chromatografii kolumnowej, stosując różne układy rozwijające. Przy dokładnej identyfikacji związków, zawartych we frakcjach, możliwe jest otrzymanie pojedynczych izolowanych związków typu makrocyklicznych laktonów po odparowaniu frakcji do suchej pozostałości.

Szczep *A. auranticolor* ATCC 31011 wytwarza przynajmniej cztery związki depsyptydowe i cztery makrocykliczne laktony. Jednakże głównymi depsyptydami są związek 37 277 (występujący w większej ilości) i 37 932 (występuje w mniejszej ilości) oraz związki typu makrocyklicznych laktonów 36 926 (główny) i 35 763 (występujący w małej ilości).

Surowy preparat mieszaniny antybiotyków, otrzymany bezpośrednio z brzeczki, jak również oczyszczone pojedyncze składniki wykazują szerokie spektrum aktywności przeciwbakteryjnej. Wśród drobnoustrojów, których wzrost hamowany jest przez antybiotyki, należy wymienić *Salmonella typhosa*, *Shigella dysenteriae*, *Escherichia co-*

li, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus faecalis*, *Diplococcus pneumoniae*, *Bacillus subtilis*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Clostridium septicum*, *Brucella abortus*, *Neisseria sicca*, *Lactobacillus acidophilus* oraz *Pasteurella multocida*.

Interesujące jest, że pojedyncze antybiotyki, otrzymywane sposobem według wynalazku, wykazują działanie przeciwdrobnoustrojowe typu bakteriostatycznego. Natomiast surowy preparat mieszaniny antybiotyków lub oczyszczone uprzednio i zmieszane związki depsyptydowe i oczyszczone związki makrocyklicznych laktonów wykazują działanie synergistyczne o charakterze bakteriobójczym.

Oznaczone indywidualnie i po zmieszaniu wobec podanych poniżej szczepów bakteryjnych, związki typu makrocyklicznego laktonu 36 926 (A) (główny składnik) i związek depsyptydowy 37 277 (B) (główny składnik) charakteryzowały się najniższymi stężeniami hamującymi w mikrogramach (ml (M.I.C.) podanymi w tablicy 1.

Tablica 1

Drobnoustrój	A	B	A+B	Surowy preparat
<i>Staph. aureus</i> 005	1.56	25	0.10 >	< 0.10
<i>Staph. aureus</i> 400	3.12	12.5	0.78 >	< 0.10
<i>Strep. faecalis</i>	100	12.5	1.56	0.20
<i>Neisseria sicca</i>	0.39	50	0.10	< 0.10
<i>Treponema hyodysenteriae</i>	—	—	—	0.19
<i>Strep. pyogenes</i>	0.39	12.5	0.10	< 0.10
<i>Bacteroides fragilis</i> 35614	25	50	0.78	0.78
<i>Clostridium inocuum</i>	6.25	> 100	0.20	0.39
<i>Lastobacillus casei</i> var. <i>casei</i>	3.12	6.25	0.20	0.39

Porównywalne wyniki uzyskano, stosując w badaniach związek typu makrocyklicznego laktonu 35 763 (A'), występujący w mniejszości i związek depsyptydowy 37 932 (B') (występujący również w mniejszej ilości), gdy oznaczane były pojedynczo, bądź w odpowiednich mieszaninach, na przykład: A' A; B' B w układzie (A'+B') (A'+B) (A+B') (A+B).

Maksymalne działanie synergistyczne obserwuje się przy połączeniu oczyszczonych związków makrocyklicznych laktonu i związku depsyptydowego w stosunku 1—2:1. Przypuszczalnie stosunek ten zachowany jest w brzeczce fermentacyjnej *A. auranticolor* ATCC 31011 i w surowym preparacie mieszaniny izolowanej z brzeczki. Stwierdzenie to jest sprzeczne z innymi doniesieniami, dotyczącymi mieszanin działających synergistycznie. Zwykle związki te w brzeczce fermentacyjnych i w surowych preparatach występowały w stosunku sub-optimalnym.

Wyniki doświadczeń przeprowadzone *in vivo* na myszach zakażonych *Staphylococcus aureus*, przy podaniu doustnym i podskórnym różnych składników antybioteku, przedstawione są w Tabeli 2.

Tablica 2

	PD ₅₀ wyrażone w mg/kg	
	<i>S. aureus</i> 01A005	
	Doustnie	Podskórnie
Związek 36 926	> 200	> 200
Związek 37 277	> 200	> 200
Związek 36 926+37 277 (1:1)	210	60
Surowy preparat mieszaniny antybiotku (próba 1, tablica 6)	150—200	72—120

Antybiotyki, otrzymywane sposobem według wynalazku, wzbudzają zainteresowanie jako czynniki wzrostowe drobiu i świń z uwagi na szerokie spektrum przeciwbakteryjne, jak również jako leki przeciwbiegunkowe, ze względu na ich dużą aktywność wobec wywołujących tę chorobę beztlenowych krętków *Treponema hyodysenteriae*.

Działanie surowego preparatu mieszaniny (Próba 1, tablica 6) jako czynnika wzrostowego określa się na młodych prosiętach w 40-dniowej próbie skarmiania. Średni dzienny przyrost wagi, ilość zuży-

tej karmy i ogólna żywotność uległy znacznej poprawie ($p < 0.01$) w porównaniu z grupą kontrolną, której nie podawano preparatu (tablica 3).

Tablica 3

Sposób żywienia	Średni przyrost wagi (kg)	Średnie zużycie karmy (kg)	Wydajność żywienia*
Kontrola (bez podawania preparatu)	0.35	0.91	2.57
Podawano preparat (próba 1, tablica 6) 50 ppm	0.63	1.35	2.15

* funt karmy na funt przyrostu wagi

Podobne wyniki można uzyskać stosując surowy preparat antybiotyku, opisany w tablicy 6, w ilości od 10 do 100 ppm.

Stosując pojedyncze czyste związki 36 926; 37 932 i 37 277 lub mieszaniny czystych związków w takiej proporcji, jak występują one w surowej mieszaninie antybiotyku, przedstawionej w tablicy 6, uzyskano wyniki podobne.

Aktywność jako czynników wzrostowych określano w próbie żywienia piskląt. Obserwuje się znaczny przyrost wagi ($p < 0.01$) piskląt, otrzymujących dietę z antybiotykiem w porównaniu z kontrolnymi, którym antybiotyku nie podawano. (Tablica 4).

Tablica 4

Sposób żywienia	Średni przyrost wagi (gramy)	Średnie zużycie karmy (gramy)	Wydajność żywienia
Kontrola (bez podawania preparatu)	566	939	1.66
Podawano preparat (próba 1, tablica 6) 10 ppm	608	941	1.56

Podobne wyniki można uzyskać, stosując w ilości 10 do 100 ppm surowy preparat antybiotyku, opisany w tablicy 6.

Stosując pojedyncze czyste związki 36 926; 37 932 i 37 277 lub mieszaniny czystych związków w takiej proporcji, jak występują one w surowym preparacie antybiotyku, przedstawionym w tablicy 6, uzyskano wyniki podobne.

Skuteczność antybiotyku, będącego przedmiotem wynalazku, w zapobieganiu infekcji badano na świniach, zakażonych drobnoustrojami, wywołującymi desynterię. W tym celu stosowano skrawki śluzówki i kolonie od zakażonych zarazkami dezynferii świń. Zdrowe świnię zakażono tym materiałem bezpośrednio. Pokarm, zawierający antybiotyk, podawano w ciągu 28 dni. Wyniki przedstawione są w tabeli 5.

Tablica 5

Sposób podania antybiotyku	(%) Zachorowalność	(%) Śmiertelność	Średni przyrost wagi (kg)
Bez antybiotyku (Próba 1), (tablica 6)	100	40	-0.13
50 ppm	0	0	0.66
37.5 ppm	0	0	0.57
25 ppm	0	0	0.68
12.5 ppm	0	0	0.61
6.25 ppm	50	10	0.47

Podobne wyniki można otrzymać, stosując w ilości 10 do 100 ppm mieszaninę antybiotyku z tablicy 6; stosując pojedyncze związki 36 926; 37 932 oraz 37 277 lub mieszaniny czystych związków w takiej proporcji, jak występują one w surowym preparacie antybiotyku, opisanego w tablicy 6, uzyskano podobne wyniki.

Przykład I. Przygotowanie płynnego sterylne- go podłoża o składzie:

	Gramy/litr
Glukoza	10.0
Skrobia rozpuszczalna	20.0
Ekstrakt drożdżowy	5.0
Enzymatyczny hydrolizat kazeiny	5.0
CaCO ₃	1.0

pH = 7.0

Szczep A. auranticolor ATCC 31 011, przechowywany na skosie z podłożem ATCC 172, przenosi się do szeregu kolb Erlenmayera o poj. 300 ml, zawierających powyższe podłoże (50 ml) i hoduje na obrotowej trzęsawce w ciągu 3—4 dni w temperaturze 28—30°C. Hodowlę tę w ilości 5 ml przenosi się ponownie do kolb Erlenmayera poj. 300 ml, zawierających po 100 ml podanego powyżej podłoża. Po wytrząsaniu w ciągu 3—4 dni w temperaturze 28—30°C, uzyskane inoculum w ilości 5—10% v/v przenosi się do fermentatora czterolitrowego, zawierającego dwa litry sterylnego podłoża o składzie:

	Gramy/litr
Ekstrakt drożdżowy	2.0
Glukoza	10.0
Wyciąg namokowy kukurydzy	1 ml
Enzymatyczny hydrolizat kazeiny	5.0
Chlorek kobaltu	0.002

pH = 7.0

Fermentację prowadzi się w ciągu 20—30 godzin w temperaturze 28—36°C, mieszając z szybkością 1700 obrotów/minutę i napowietrzając hodowlę około jednej objętości powietrza na objętość brzeczki na minutę.

Jeżeli jest to konieczne, pH całej brzeczki doprowadza się do 7.0, a następnie brzeczkę ekstrahuje 1/3 do 1/2 objętości ketonem metyloizobutylo- wym. Ekstrakt zatęża się przy zmniejszonym ciśnieniu i odfuszcza przez ekstrakcję eterem naf-

towym. Zawartość antybiotyku w brzeczce, w ekstrakcie i we frakcjach, uzyskiwanych w dalszych etapach oczyszczania, określa się metodą chromatografii cienkowarstwowej na żelu krzemionkowym, z użyciem rozpuszczalników chloroform-etanol (9:1) i obserwację chromatogramów w świetle ultrafioletowym przy 254 i 366 mμ. Odtłuszczony i zatężony roztwór odparowuje się przy zmniejszonym ciśnieniu do sucha. Suchą pozostałość poddaje się przeciwpładowemu rozdzielaniu w aparacie Craiga (6 płyt), stosując układ: toluen, 5 części: etanol, 2 części: bufor fosforanowy pH = 4.5, 3 części. Aparat napełnia się fazą górną i fazą dolną po ich uprzednim rozdzielaniu. Po zakończeniu podziału, frakcje poddaje się chromatografii cienkowarstwowej.

Związek depsyptydowy 37 277 odnajduje się w górnej fazie w płycie 0. Drugi związek depsyptydowy 37 932 również przechodzi do fazy górnej i odnajduje się w płytach 1, 2 i 3. Związek typu makrocyclicznego laktonu 35 763 przechodzi do fazy dolnej płyt 0 i 1. Związek 36 926 odnajduje się w dolnej fazie płyt 2, 3, 4 i 5.

Fazę górną płyty 0, zawierającą związek 37 277 odparowuje się przy zmniejszonym ciśnieniu do suchej pozostałości, rozpuszcza w chloroformie i miesza około 30 minut z węglem aktywowanym. Przesącz sący się i odparowuje przy zmniejszonym ciśnieniu. Pozostałość rozpuszcza się w acetonie, a następnie wytrąca się osad przez dodanie heptanu. Osad rozpuszcza się w małej ilości chloroformu i poddaje rozdzielaniu chromatograficznemu na kolumnie, wypełnionej buforowanym w pH = 6 żelem krzemionkowym, zawieszonym w układzie chloroform: n-propanol (99:1% v/v). Kolumnę rozwija się tym samym układem przy ciśnieniu 80 psi. Frakcje zebrane z kolumny poddaje się chromatografii. Frakcje zawierające związek 37 277 łączy się, odparowuje przy zmniejszonym ciśnieniu i uzyskany związek krystalizuje się z mieszaniny aceton-heptan.

Związek 37 277 nie posiada określonej temperatury topnienia, ulega bowiem rozkładowi przy temperaturze 140–150°C. Związek ten jest nierozpuszczalny w eterze dwuetylowym, heksanie, heptanie i w wodzie. Jest słabo rozpuszczalny w acetonie, benzynie i łatwo rozpuszczalny w metanolu, etanolu, chloroformie i chlorku metylowym. Związek 37 277 charakteryzuje się następującymi właściwościami:

Węgiel	60.91
Wodór	5.98
Azot	10.45
Tlen (z różnicy)	22.66

Związek 37 277 jest optycznie czynny i wykazuje skręcalność (α)_D^{25°} = +11° (c = 1.0, EtOH). Rozpuszczony w etanolu wykazuje absorpcję w nadfiolecie przy 225, 274, 282, 303 oraz 355 mμ; ekstynkcja właściwa odpowiednio wynosi E_{1cm}^{1%} = 309.3; 36.67; 45.01; 70 i 20.

Widmo w podczerwieni związku 37 277 przedstawione jest na fig. 1. W roztworze chloroformowym obserwuje się w podczerwieni charakterystyczne

pasma absorpcji przy 3.05; 3.40; 5.70; 5.77; 5.93; 6.07; 6.62; 6.82; i 7.67 mikronów.

Frakcje z rozdziału przeciwpładowego, zawierające związki 35 763 i 36 926, odparowuje się przy zmniejszonym ciśnieniu, a pozostałość rozpuszcza się w octanie etylu i uzyskany roztwór miesza z żelem krzemionkowym. Roztwór po odsączeniu żelu odparowuje się przy zmniejszonym ciśnieniu, a pozostałość ponownie rozpuszcza się w octanie etylu, wytrącając następnie osad przez dodanie heksanu. Oddzielony osad rozpuszcza się w małej ilości chloroformu i poddaje się chromatografii na żelu krzemionkowym buforowanym w pH = 6 i zawieszonym w octanie etylu. Kolumnę rozwija się mieszaniną octanu etylu: czterowodorofuranu: heksanu (80:20:20), wysyconą buforem fosforanowym pH = 6.0 przy ciśnieniu 80 psi. Pierwsze 20 ml frakcje zebrane w ilości 17 zawierają żółtawy olej, który odrzuca się. Frakcje od 26 do 40 zawierają związek 36 926. Frakcje od 41 do 50 zawierają mieszaninę związków 36 926 i 35 763. Frakcje od 26 do 40 łączy się, zatęża przy zmniejszonym ciśnieniu i ponownie poddaje rozdzielaniu chromatograficznemu na żelu krzemionkowym, zbierając 20 ml frakcje. Pierwsze 15 frakcji zawierają żółty olej, który odrzuca się. Frakcje od 16 do 30 zawierają związek 36 926. Frakcje 31–40 zawierają mieszaninę związków 36 926 i 35 763. Frakcje od 16 do 30 odparowuje się przy zmniejszonym ciśnieniu i pozostałość rozpuszcza się w małej ilości chloroformu, a następnie podaje na kolumnę z żelem fosforanowym buforowanym w pH = 6.0 i zawieszonym w chloroformie. Kolumnę rozwija się mieszaniną chloroformu: etanol (95.5:4.5% v/v) przy ciśnieniu 130 psi, zbierając 160 frakcji o objętości 6 ml. Frakcje od 60 do 90 zawierają wyłącznie związek 36 926. Frakcje te łączy się i odparowuje przy zmniejszonym ciśnieniu. Pozostałość rozpuszcza się w małej ilości etanolu i po dodaniu eteru wytrąca się osad bezpostaciowy związku 36 926.

Związek 36 926 rozpuszcza się w metanolu, etanolu, chloroformie i chlorku metylenowym. Jest nierozpuszczalny w eterze dwuetylowym, heksanie i heptanie.

Związek 36 926 nie posiada określonej temperatury topnienia, bowiem ulega rozkładowi przy około 100°C. Analiza związku wykazuje obecność:

Węgla	57.89
Wodoru	6.78
Azotu	8.04
Tlenu (z różnicy)	27.29

Ciepła cząsteczkowy w oparciu o spektrum masowe wynosi 501, a wzór sumaryczny określono C₂₆H₃₅N₃O₇.

Związek 36 926 wykazuje skręcalność optyczną (α)_D^{25°} = –130 (c = 1.0, EtOH). Widmo w ultrafiolecie wykazuje maksimum przy 214 mμ, w etanolu i absorpcję właściwą E_{1cm}^{1%} = 723.8.

Widmo w podczerwieni związku 36 926 przedstawione jest na fig. 2. Oznaczane metodą tabletki KBr wykazują następujące pasma absorpcji: 2.95; 3.40; 5.75; 5.98; 6.23; 6.58; 6.87; 7.45; 8.25; 8.38; 8.80; 9.08; 10.15; 10.35; 11.10 i 13.30 mikronów.

Związek ten jest podobny, bądź identyczny z antybiotykiem A2315B, który przedstawiono na Czternastej Konferencji na temat czynników przeciwdrobnoustrojowych i chemioterapii, 11–13 września 1974.

Związek 35 763 izoluje się i oczyszcza zblizoną metodą do tej, którą stosuje się do związku 36 926. Związek ten po oczyszczeniu rozpuszcza się w metanolu, etanolu, chloroformie i chlorku metylenu. Jest on nierozpuszczalny w eterze dwuetylowym, heksanie i heptanie. Nie wykazuje określonej temperatury topnienia, rozkłada się bowiem przy temperaturze około 100°C.

Analiza związku wykazuje obecność:

Węgla	61.29
Wodoru	6.73
Azotu	8.83
Tlenu (z różnicy)	23.15

Ciepota cząsteczkowa w oparciu o spektrum masowe wynosi 503, a wzór sumaryczny określono $C_{20}H_{27}N_3O_7$.

Związek 35 763 jest czynny optycznie i wykazuje skręcalność $(\alpha)_D^{25} = -114^\circ$ ($c = 1.0$, EtOH).

Widmo w ultrafioletcie wykazuje maksimum przy 218 mμ i absorpcję właściwą $E_{1\text{cm}}^{1\%} = 668.9$.

Widmo w podczerwieni związku 35 763 przedstawiono na fig. 3. Oznaczone metodą tabletki KBr wykazuje następujące pasma absorpcji: 2.95; 3.38; 5.73; 6.00; 6.23; 6.60; 6.88; 7.23; 8.25; 8.38; 8.83 i 10.20 mikronów.

Związek 35 763 jest podobny, bądź identyczny z antybiotykiem A-2315 opisanym w zgłoszeniu holenderskim 7 310 613.

Fracje po rozdiale przeciwpadowym, zawierające związek 37 932, odparowuje się przy zmniejszonym ciśnieniu do suchej pozostałości, którą ekstrahuje się eterem naftowym, a następnie poddaje rozdzielowi chromatograficznemu na kolumnie z żelalem krzemionkowym w identyczny sposób, jak podano powyżej. Frakcje właściwe łączy się i związek 37 932 otrzymuje się przez krystalizację z mieszaniny aceton : heptan.

Związek 37 932 jest rozpuszczalny w metanolu, etanolu, chloroformie i chlorku metylenowym. Jest nierozpuszczalny w eterze dwuetylowym, heksanie, heptanie i wodzie. Związek ten nie wykazuje określonej temperatury topnienia. Rozkład rozpoczyna się około 185°C. Analiza elementarna wykazuje obecność:

Węgla	59.41
Wodoru	6.01
Azotu	10.66
Tlenu (z różnicy)	23.92

Związek 37 932 jest optycznie czynny i wykazuje skręcalność optyczną $(\alpha)_D^{25} = +5.0^\circ$ ($c = 0.25$, $CHCl_3$). Widmo w ultrafioletcie roztworu etanolowego wykazuje maksima absorpcji przy 226, 276, 283, 305 i 355 mμ i absorpcję właściwą $E_{1\text{cm}}^{1\%}$ odpowiednio 304.4, 36.8, 43.49, 70.25 i 20.07.

Widmo w podczerwieni związku 37 932 przedstawiono na fig. 4. Oznaczone metodą tabletki KBr wykazują następujące pasma absorpcji: 2.96, 3.05, 3.38, 5.68, 5.73, 5.93, 5.98, 6.13, 6.50, 6.58, 6.88, 7.40, 7.65, 8.08, 8.45, 8.60, 9.03, 9.45, 9.70, 9.98, 10.55, 11.00, 11.25, 11.60, 12.35 i 13.25 mikronów.

Przykład II. Metodę według przykładu I można powtórzyć, uzyskując porównywalne wyniki, przy użyciu podłoża hodowlanego o składzie:

	Gramy/litr
Glukoza	8.0
Tryptofan	3.0
Enzymatyczny hydrolizat kazeiny	1.0
Kwas glutaminowy	1.0
Mąka sojowa	0.5
NaCl	8.3
K_2HPO_4	2.4
KH_2PO_4	2.0
$MnCl_2$	0.02

Przykład III. Metodę według przykładu I można powtórzyć, uzyskując porównywalne wyniki, przy użyciu podłoża hodowlanego o składzie:

	Gramy/litr
Glukoza	10.0
Mąka sojowa	10.0
Wyciąg namokowy kukurydzy	1 ml

Przykład IV. Metodę według przykładu I można powtórzyć, uzyskując porównywalne wyniki, przy użyciu podłoża hodowlanego o składzie:

	Gramy/litr
Melasa	10.0
Enzymatyczny hydrolizat kazeiny	1.0
Ekstrakt drożdżowy	2.0
Wyciąg namokowy kukurydzy	1 ml
Kazeina	3.0

Przykład V. Metodę według przykładu I powtarza się. Ekstrakt metyloizobutylo-ketonowy z brzeczki po zakończeniu fermentacji odparowuje się do suchej pozostałości przy zmniejszonym ciśnieniu i pozostałość tę ekstrahuje się eterem naftowym. Uzyskany sypki preparat rozdrabnia się i oznacza w nim zawartość ilościową składników przy użyciu metody ciśnieniowej chromatograficznej. Skład surowego preparatu mieszaniny antybiotyku z kilku niezależnie prowadzonych fermentacji przedstawiono w tablicy 6 (w procentach):

Tablica 6

Nr próby	35 763	36 926	37 932	37 277	Składniki mieszane
1.	8.5	32.0	8.7	19.3	1.3
2.	3.1	39.5	7.8	15.9	1.2
3.	6.0	38.6	10.7	25.5	2.4
4.	9.4	47.8	0.9	26.9	0.5
5.	8.4	31.9	2.2	20.3	1.4

Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób wytwarzania mieszaniny antybiotyków 35 763, 36 926, 37 277 i 37 932, **znamienny tym**, że szczep *Actinoplanes auranticolor* ATCC 31011 hoduje się w hodowli podpowierzchniowej napowietrzanej, na wodnym płynnym podłożu, zawierającym przyswajalne źródło węgla i azotu, aż do uzyskania znacznej aktywności antybiotycznej, a na-

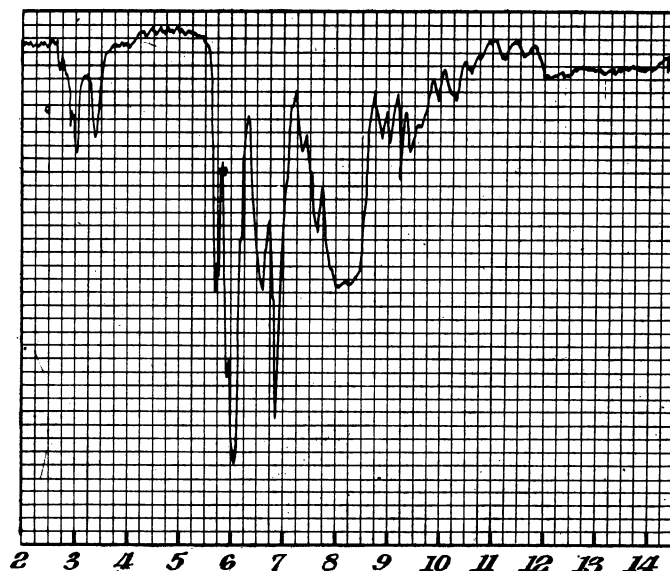
stępnie poszczególne antybiotyki lub ich mieszaninę wydziela się z hodowli.

2. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że hodowlę prowadzi się w temperaturze 28–36°C.

5 3. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że składniki antybiotyczne wydziela się z brzezki fermentacyjnej na drodze ekstrakcji rozpuszczalnikiem takim, jak chloroform, octan etylu lub keton metylowoizobutylový.

Fig.1.

37,277

*Fig.2.*

36,926

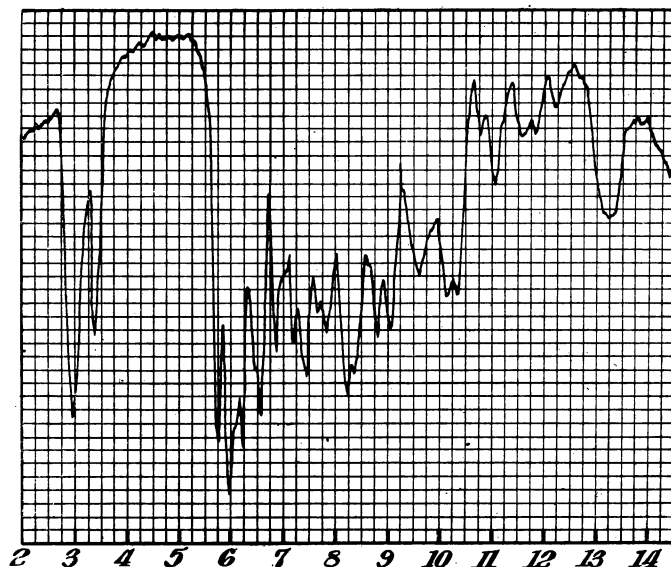
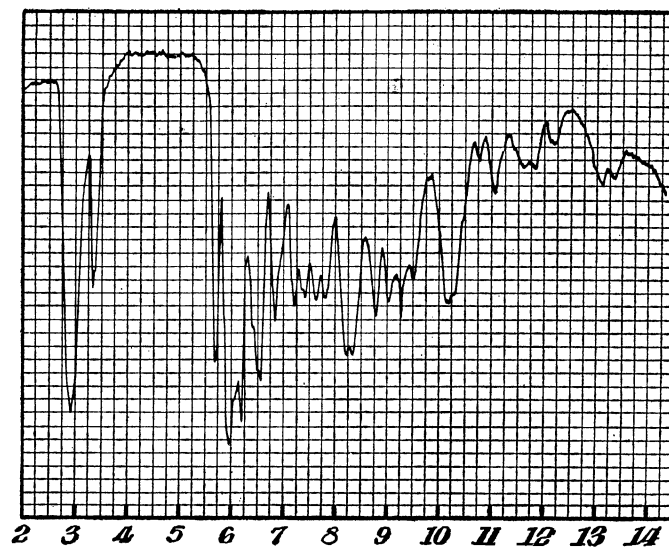


Fig.3.

35,763

*Fig.4.*

34932

